

Title	In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells.(Abstract_要旨)
Author(s)	Ishikura, Yukiko
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20285
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医科学）	氏 名	石 藏 友 紀 子
論文題目	<i>In Vitro</i> Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. (試験管内における多能性幹細胞から精原幹細胞活性の誘導と増幅)		
(論文内容の要旨)			
<p>生殖細胞は、遺伝情報とその修飾情報（エピゲノム情報）を次世代に継承し、新たな個体を産出する唯一の細胞である。生殖細胞発生過程の試験管内再構成は、生殖細胞発生機構の解明を促進し、不妊の原因究明や、遺伝病発症機構の解明に繋がる。これまでに、マウス多能性幹細胞から、機能的な精子および卵子の形成に寄与する、始原生殖細胞様細胞(Primordial germ cell-like cells; PGCLCs)を誘導する系が報告された。本研究では、雄性生殖細胞発生過程の試験管内再構成研究を発展させるため、PGCLCs を成体における精子産出の起源となる精原細胞/精原幹細胞まで、試験管内で誘導することを目的とした。</p> <p>雄性生殖細胞系列における、精原細胞への分化開始時の微小環境に着目し、PGCLCs を胎齢 12.5 日の雄性生殖巣体細胞と凝集させて「再構成精巣」を作製、精原細胞の分化を誘導する培養条件を検討した。その結果、3 週間の培養にて精原細胞/精原幹細胞のマーカーである PLZF が陽性となる条件を決定することに成功した。精原細胞/精原幹細胞は生殖幹細胞(Germline stem cells: GSCs)として、試験管内で長期培養可能なことが報告されている。そこで再構成精巣を解離し、PGCLCs 由来の精原細胞様細胞を GSCs 培養条件下にて培養した。その結果、増殖能や転写産物が GSCs とほぼ同等な細胞株の樹立に成功した。この細胞株を GSCLCs(Germline stem cell-like cells)と命名した。次に、GSCLCs を生殖細胞欠損マウスの精巣に移植し、その機能を検証した。GSCLCs は、成体マウス精巣にて、樹立した 15 株すべてで生着が確認出来、その内 3 株で生着コロニーの約 20%に精子形成が観察された。さらに、得られた精子から、健常な産仔と子孫を得ることができた。以上の結果は、多能性幹細胞を起点とし、再構成精巣を用いて精原幹細胞能を有する細胞株が樹立可能であることを示している。</p> <p>一方で、上述したように、樹立した GSCLCs は GSCs に比べ精子形成効率が低かった。その原因を解明するため、GSCLCs と GSCs の transcriptome と DNA methylome を比較解析した。GSCLCs では、全体の約 4.4%(407)の遺伝子が GSCs よりも低発現であり、それらの遺伝子には精原幹細胞の分化に重要な遺伝子が含まれていた。また、GSCLCs では、GSCs に比べ高メチル化を示す制御領域が存在し、それらには精子分化に重要な遺伝子の制御領域が含まれていた。両解析に共通する遺伝子では、過剰なメチル化と転写産物の低発現の相関が示された。さらなる解析から、GSCLCs において過剰なメチル化が付与される領域は、PGCs がエピゲノムリプログラミングを経て精原細胞に分化する過程でメチル化制御の異常を受けやすい領域であることが示唆された。次に、GSCLCs と GSCs の 1 細胞 transcriptome 解析を行い、1 細胞群間における、転写産物の発現レベルの差異の標準偏差を比較した。その結果、GSCLCs は GSCs と同等の均一性を有する細胞群であることが示唆された。これらの結果は、GSCLCs による精子形成は、一部の細胞集団による寄与でなく、ランダムな選択の結果である可能性を示唆する。以上の結果は、精原細胞/精原幹細胞形成過程におけるエピゲノム制御の重要性を示し、その異常が精子形成不全の原因となる可能性を示唆した。</p> <p>本研究結果は、精原細胞/精原幹細胞の発生機構の解明と、その異常に起因する、男性</p>			

不妊、エピゲノム異常症、遺伝病発症の原因究明に寄与すると期待される。	
(論文審査の結果の要旨)	
生殖細胞の発生機構の解明とその試験管内再構成は、発生生物学のみならず、発生工学や生殖医学の発展に寄与する。これまで、マウス多能性幹細胞から、始原生殖細胞（primordial germ cells: PGCs）と同等な機能を有する始原生殖細胞様細胞（PGC-like cells: PGCLCs）を試験管内誘導する系が報告されてきた。本研究では、雄性生殖細胞発生過程の試験管内再構成を推進し、PGCLCs から、精原（幹）細胞及びその培養細胞株である生殖幹細胞（germline stem cells: GSCs）を誘導する系の開発と評価を目的とした。	
PGCLCs は、胎仔生殖巢体細胞と凝集培養（再構成精巢）すると、精原（幹）細胞様細胞に分化し、再構成精巢から生殖幹細胞様細胞（GSC-like cells: GSCLCs）が樹立された。GSCLCs は、PGCLCs と異なり、成体精巢に生着し、その一部は精子形成・健常な産仔に寄与した。一方で、GSCLCs は、精原（幹）細胞活性や減数分裂に重要な遺伝子を含む一部の遺伝子（全遺伝子の約 5%）のプロモーターに過剰なメチル化を有し、それらの発現は抑制される傾向にあった。これら過剰メチル化は、GSCLCs 誘導過程における脱メチル化もしくは過剰メチル化抑制の不全に由来することが示唆された。以上の結果は、マウス多能性幹細胞から精原幹細胞活性を有する細胞の試験管内誘導が可能であることを示し、その過程、さらには生体での精原（幹）細胞形成過程における DNA メチル化制御が正常な精子形成に重要であることを示唆するものである。	
以上の研究は、雄性生殖細胞発生過程の試験管内再構成法の開発とその過程における DNA メチル化制御機構の解明に寄与するところが大きい。	
したがって、本論は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。	
なお本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。	

